

Validación del método de ensayo de Coliformes totales y fecales por la técnica de
Número más probable (NMP) en la calidad del queso fresco producido a pequeña
escala

AUTORES:
ELIZABETH CASTAÑO MORENO
SARA MELISA BERNAL OSORIO

TRABAJO DE GRADO
Presentado como requisito
Para optar el título de
MICROBIOLOGA

UNIVERSIDAD LIBRE SECCIONAL PEREIRA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE MICROBIOLOGIA
PEREIRA, NOVIEMBRE 30 DE 2015

Título del Proyecto

Validación del método de ensayo de Coliformes totales y fecales por la técnica de Número más probable (NMP) en la calidad del queso fresco producido a pequeña escala

Identificación del investigador principal

Elizabeth Castaño Moreno

Lic. Biología y Química

MSc. Microbiología

Docente investigador. Universidad Libre Seccional Pereira

Semillero de investigación en Seguridad Alimentaria

Identificación del auxiliar de investigación

Sara Melisa Bernal Osorio

Estudiante de microbiología octavo semestre.

Semillero de investigación en Seguridad Alimentaria

Resumen Ejecutivo:

Un laboratorio de análisis microbiológico que desee prestar un servicio que garantice a través de los resultados emitidos confiabilidad y seguridad a sus clientes, debe llevar a cabo procedimientos y métodos que le permitan proporcionar evidencias altamente confiables, por lo tanto, el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Libre Seccional Pereira, debe controlar y asegurar la calidad de sus resultados en alineación con parámetros nacionales e internacionales, para de esta forma garantizar la calidad en el desarrollo de los métodos microbiológicos.

El proceso de validación de un método facilita la reunión de evidencias que pruebe que el método va a cumplir las funciones para el cual fue creado. Por lo tanto, la validación busca que las condiciones iniciales obtenidas en un ensayo, puedan ser desarrolladas por el laboratorio en el que se vaya a desarrollar la técnica de igual forma, garantizando la confiabilidad de los resultados que arrojen dichos métodos.

El objetivo del estudio consiste en realizar la validación del método utilizado en el laboratorio de Microbiología en la determinación de microorganismos indicadores: determinación de Coliformes totales, determinación de Coliformes fecales, *Escherichia coli*, por la técnica de Número más Probable, NMP, mediante la estimación de parámetros como la especificidad, sensibilidad, repetibilidad y reproducibilidad; utilizando 2 matrices diferentes para cada método de análisis.

Palabras Clave

Queso, NMP, coliformes totales y fecales, validación

1. Planteamiento del problema:

El instituto Nacional de Salud, INS, en el presente año reportó en Colombia 2.075 casos desde enero hasta abril de Enfermedades Transmitidas por Alimentos, ETAs(1); tema que obliga a las empresas productoras de alimentos a controlar todo lo relacionado con la seguridad e inocuidad alimentaria, para garantizar a los consumidores alimentos de calidad que no comprometan su salud.

Los consumidores de leche y derivados lácteos cada día exigen más garantías de inocuidad y calidad del producto y sus derivados, por tal razón la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación,FAO implementó un enfoque mundial para la calidad e inocuidad de los alimentos al cual denomino “de la granja a la mesa”(2), en donde en el ámbito de la producción de derivados lácteos, la producción de leche en las fincas es el primer paso en este enfoque mundial, por lo que los productores deben tener conciencia de su responsabilidad en la inocuidad de la leche producida en sus hatos, ya que la calidad de la misma tendrá un impacto en la elaboración de todos sus subproductos como el queso.

Existen una serie de microorganismos denominados indicadores que pueden ser utilizados para determinar la calidad microbiológica de los alimentos relacionados a la vida útil o a la presencia de patógenos, dichos indicadores suelen ser utilizados para el análisis de las condiciones de inocuidad de los alimentos siendo así un factor clave y relevante en el estudio de la calidad de la leche y el queso.

El análisis de Coliformes fecales y Totales da un amplio conocimiento y enfoque respecto a la calidad de la matriz a evaluar, en quesos, los recuentos de estos indicadores dan a entender las malas prácticas higiénicas empleadas desencadenando la contaminación del alimento, llegándose a presentar Enfermedades por transmisión de Alimentos ETA's y presencia de otras bacterias altamente patógenas y perjudiciales para la salud.

Por esta razón, se requiere realizar seguimiento a la calidad microbiológica para determinar la confiabilidad del producto y el cumplimiento de los parámetros establecidos por la legislación nacional.

Por tal motivo, los laboratorios de análisis microbiológico de alimentos buscan día a día optimizar el tiempo, los recursos, reducir costos y principalmente ofrecer resultados confiables realizando procedimientos o implementando técnicas basadas en normas que otorgan reconocimiento como la norma NTC / ISO-IEC 17025, la cual promueve la acreditación de los laboratorios cuando se da total cumplimiento a sus especificaciones.

Para la acreditación de laboratorios de ensayo basados en la norma NTC / ISO-IEC 17025, se tienen en cuenta una serie de procedimientos a seguir, dentro de los que se encuentra la estandarización y documentación de técnicas y/o métodos de análisis que se llevan a cabo dentro del laboratorio. La implementación de la validación de los métodos más frecuentemente utilizados para el análisis de

alimentos, dentro de los que se encuentra coliformes totales, y coliformes fecales *E. coli*; los cuales constituyen un indicador de calidad importante para el control de inocuidad de productos alimenticios.

Por tal motivo se hace necesario llevar a cabo el proceso de validación de Determinación de Coliformes totales y fecales *E.coli* utilizada en el laboratorio de microbiología de La Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Libre Seccional Pereira, para el análisis de quesos frescos.

La acreditación de este método de análisis microbiológico de alimentos constituye un factor de competitividad técnico científico en la regional fortaleciendo los procesos de gestión de calidad del sector agroalimentario, garantizando en todas las actividades analíticas la competencia técnica y confiabilidad de los resultados dados por el laboratorio.

2. Justificación:

La calidad e inocuidad de los alimentos destinados al consumo humano han obligado a las industrias a ofrecer productos seguros de acuerdo a las exigencias de la legislación nacional e internacional, fortaleciendo sus sistemas de calidad.

Las industrias lácteas no son ajenas a este proceso, por lo cual se ven implicadas en el proceso de calidad e inocuidad desde el proveedor de materia prima, requiriendo así la implementación por parte de este de las buenas prácticas pecuarias y buenas prácticas agrícolas, ya que al momento de verificar la calidad e inocuidad en la leche cruda, se ven múltiples implicaciones por parte del ordeñador destacándose entre ellas el mal lavado de manos que tiene para realizar el ordeño, falta de garantía de producir una leche exenta de riesgos biológicos representados por la presencia de bacterias como la *Brucella spp.* y *Mycobacterium spp.* ya que son muy pocos los predios que cuentan con la certificación oficial actualizada de ausencia de Brucelosis y Tuberculosis para el hato; múltiples fallas se presentan en el proceso de la cadena de frío donde se advierten factores que afectan la calidad de la leche debido a las condiciones ausentes de refrigeración, entre otros.

El queso es uno de los productos con más riesgo epidemiológico, debido a que es consumido en fresco, es decir, no necesita ningún tipo de cocción, representando un mayor riesgo para el consumidor, especialmente en los casos que este tipo de alimento ha sido elaborado a partir de la leche cruda, es decir, aquella sin ningún tipo de tratamiento térmico. Por tal razón se ha visto la necesidad de controlar en mayor medida este tipo de alimento.

El acceso a los exigentes mercados importadores se ve afectado por el hecho de que el gobierno nacional y las industrias del país, están poco familiarizados con los requisitos de los países importadores de alimentos.

En los Sistemas de Calidad Alimentaria, la tendencia es exigir que los productores aseguren la inocuidad del producto desde el lugar de origen hasta el punto de consumo. Esto debe estar garantizado mediante certificados emitidos por

organismos reconocidos y con certificados de análisis acreditados; por ello, cada país debe contar con un Sistema de Vigilancia y Control de productos alimenticios, como el Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos, INVIMA, en Colombia, que tiene como misión promover y asegurar la inocuidad y calidad de los alimentos, con el fin de prevenir enfermedades transmitidas por los alimentos, ETAs, proteger la salud del consumidor y facilitar el comercio internacional, promoviendo y fortaleciendo el desarrollo e interacción de los laboratorios analíticos dentro del marco de programas nacionales integrados de protección de los alimentos.

En la actualidad el INVIMA hace parte de los 56 laboratorios, miembros de la Red Interamericana de Laboratorios de Análisis de Alimentos, RILAA. A nivel internacional desde junio de 1997, la Comisión del Codex Alimentarius recomienda que los laboratorios responsables del control de alimentos cumplan con los requisitos de la norma ISO/IEC 17025 y sean acreditados por un organismo competente. Por otra parte el Comité del Codex de Métodos de Análisis y Muestreo, CX/MAS y la Directiva 93/99 EEC de la Unión Europea, en vigencia, sólo recomienda métodos acreditados con la norma ISO/IEC 17025 y establece que los laboratorios de control de alimentos deberán acreditarse con normas internacionalmente reconocidas como la ISO/IEC 17025, participar en programas interlaboratorios y emplear métodos validados.

La Red Interamericana de Laboratorios ha evidenciado problemas en la implementación de programas de aseguramiento de calidad y un escaso número de laboratorios acreditados. Esta situación determina que los países de América Latina y el Caribe tengan dificultades para que los productos alimentarios cumplan con las normas internacionales que exigen certificación y resultados de ensayo con reconocimiento internacional. En particular, los resultados obtenidos por los laboratorios de microbiología basados en principios de aseguramiento de calidad, validados y acreditados son internacionalmente reconocidos y considerados de referencia para la evaluación de conformidad de los productos de intercambio en el comercio internacional.

Una encuesta realizada por la Cooperación Internacional de Acreditación de Laboratorios, ILAC, en el año 2003 a más de 2000 laboratorios acreditados de los cinco continentes evaluó las dificultades de los laboratorios relativas a la conversión a la ISO/IEC 17025. Los dos problemas más importantes informados y sobre los cuales los laboratorios aseguraron necesitar mayor entrenamiento fueron la validación de métodos y la estimación de la incertidumbre. En dicha encuesta se concluyó que más del 65% de los laboratorios tuvo dificultades con la validación de sus metodologías. Sobre la base de estos antecedentes la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, FAO, aprobó en diciembre de 2004 “Desarrollo de un sistema integral de aseguramiento de la calidad para laboratorios de análisis de alimentos en América del Sur”, TCP/RLA/3013 (A), con la finalidad, de proveer conocimientos teóricos y prácticos sobre el aseguramiento de la calidad y la validación de métodos microbiológicos, basado en la norma ISO/IEC 17025, a Costa Rica, Cuba, El salvador, Guatemala, Honduras, México, Nicaragua, Panamá y República Dominicana, para optar a la acreditación de

laboratorios microbiológicos de alimentos y así demostrar su capacidad analítica y la validez de los resultados emitidos(3).

Actualmente el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Salud de Universidad Libre Seccional Pereira, realiza análisis microbiológico en el desarrollo de proyectos de investigación del sector agroalimentario, caracterización de la calidad higiénica sanitaria de materias primas y productos terminados. Por esta razón, se busca estandarizar, validar e implementar procedimientos de análisis que permitan la acreditación, con el propósito de ser un laboratorio de referencia regional y/o nacional para sector agroalimentario.

3. Objetivos:

3.1. Objetivo General:

Revisión para la validación y verificación de Coliformes Totales y fecales por el método de Número más probable (NMP) para muestras de queso fresco analizadas en el Laboratorio de Microbiología en la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Libre Seccional Pereira

3.2. Objetivos Específicos:

- Evaluar la calidad de los medios de cultivo a utilizar en el análisis, mediante pruebas de esterilidad, pruebas de selectividad y productividad.
- Comprobar la sensibilidad y especificidad del método de número más probable, utilizado para determinar Coliformes Totales y fecales.
- Demostrar la precisión del método Numero más probable NMP para la identificación de Coliformes totales y fecales en el laboratorio de microbiología, por comparación con los métodos que dicta la norma NTC 5014.
- Realizar el análisis estadístico de los resultados obtenidos, para garantizar la confiabilidad de los ensayos microbiológicos de alimentos.

4. Marco Teórico

4.1. La calidad de la leche cruda.

La calidad de la leche cruda es la base de la competitividad, necesaria para la participación en los mercados nacionales e internacionales(2), por tal razón y a las dinámicas actuales en los mercados, se ve la necesidad de ofrecer a los productores herramientas de análisis que ayuden a la obtención de leche de buena calidad que pueda cumplir con las reglamentaciones higiénico-sanitarias establecidas por la normatividad, para así obtener un producto de alta calidad.(2, 4-7)

La leche es definida por el decreto 616 de 2006 como el producto de la secreción mamaria normal de animales bovinos, bufalinos y caprinos lecheros sanos, obtenida mediante uno o más ordeños completos, sin ningún tipo de adición, destinada al consumo en forma de leche líquida o a elaboración posterior(8).

La leche de vaca en sus diferentes presentaciones, es la leche más consumida a nivel mundial y aún ocupa un lugar importante en la nutrición humana(9), por ende es de vital importancia brindar un producto lácteo confiable y sano, permitiendo asegurar la salud del consumidor(10) (11).

En Colombia uno de los grandes problemas que afecta la calidad de la leche y por ende su competitividad en el sector lácteo es proveniente de la contaminación externa como los utensilios empleados en la granja lechera (ordeño, tanques, cubetas para transporte, tuberías y silos), además la temperatura correspondiente y el período de almacenamiento de la leche, dado que, son factores que están directamente conectado a la proliferación de microorganismos(9, 12), el ordeñador también tiene un rol muy importante, debido a que, afecta de manera directa la calidad de la leche sus prácticas durante el ordeño(13).

4.1.1. Bacterias en leche cruda

Las bacterias en leche cruda pueden afectar la calidad, seguridad y aceptación del consumidor, llegándose a presentar cuadros de enfermedades zoonóticas como brucelosis, leptospirosis, listeriosis, salmonelosis y tuberculosis(13), y enfermedades de transmisión alimentaria (ETA's) por bacterias patógenas clásicas como *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp*(14). y *Bacillus cereus*, y durante la última década se han aislado otro tipo de agentes responsables, denominados patógenos emergentes entre los que se encuentran *Listeria monocytogenes*,(15-17) *Campylobacter jejuni* y *Escherichia coli* O157 : H7(5, 18)

4.2.

Produc

ción de queso fresco a pequeña escala.

La norma Técnica colombiana NTC 5894 define al queso como el producto blando, semiduro y extra duro, madurado o no madurado, y que puede estar recubierto, en el que la proporción entre las proteínas de suero y la caseína no sea superior a la de la leche, donde el queso fresco es elaborado a partir de leche higienizada, sin madurar, que después de su fabricación está listo para el consumo(19).

Los quesos hechos con leche sin pasteurizar parecen estar asociados con brotes de intoxicaciones alimentarias con mayor frecuencia que los fabricados a partir de leche pasteurizada, aunque estos también pueden llegar a ocasionar toxiinfecciones por causas como una inadecuada pasteurización de la leche o por contaminación posterior a la elaboración.(20, 21)

Diferentes enfermedades se han asociado con el consumo de queso, llegándose a presentar incidencia de ETA's inclusive en los quesos elaborados con leche pasteurizada, en algunas muestras se han podido apreciar elevados conteos de coliformes totales y fecales, debido a los problemas sanitarios en la preparación y venta de alimentos, como la manipulación incorrecta y el mantenimiento de este

tipo de productos a temperatura ambiente durante un tiempo prolongado.(14, 22)

En Colombia se ha evidenciado la producción de queso fresco a partir de leche cruda, es decir, sin ningún tratamiento térmico lo cual genera una serie de riesgos significativos para el consumidor. Por tal motivo se hace necesario conocer la calidad de los quesos frescos tanto fisicoquímica como microbiológicamente. Para esta primera se emplean indicadores como son: contenido de humedad, pH y actividad de agua (aw)(23, 24) y la calidad microbiológica la cual permite identificar la existencia de patógenos presentes en dicho alimento, ya sea por contaminación de la materia prima o contaminación en su elaboración.(14)

4.3. Indicadores de Seguridad y Calidad Microbiológica.

Los microorganismos indicadores son aquellos cuya presencia en los alimentos sugiere una inadecuada manipulación de la materia prima o el alimento, además de la existencia de un peligro para la salud del consumidor (microorganismos patógenos, toxinas), o una falencia en algún proceso destinado al saneamiento(14). Pueden ser utilizados para determinar la calidad microbiológica de los alimentos relacionada a la vida útil o a la presencia de patógenos. En general, los indicadores son a menudo utilizados para analizar las condiciones de inocuidad de los alimentos.

Entre los microorganismos indicadores se encuentran coliformes totales, coliformes fecales o termotolerantes, *Escherichia coli*(25), *Staphylococcus aureus* y *Salmonella*(14, 26, 27)

Los microorganismos indicadores de contaminación fecal más utilizados son los pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, es decir, Coliformes totales y Coliformes fecales(28), *Escherichia coli*(14), *Clostridium perfringens* y el grupo estreptococos fecales(25, 29, 30)

4.3.1. Indicadores de la Seguridad de un Alimento.

Los indicadores microbianos son más utilizados para analizar la seguridad y condiciones higiénicas de un producto alimenticio que para determinar la calidad. Principalmente, un indicador de seguridad alimentaria debe poseer los siguientes criterios:

- Ser rápidamente detectable.
- Ser fácilmente distinguible de otros miembros de la microbiota alimentaria.
- Ser un organismo cuyo número podría estar correlacionado con aquellos del patógeno de interés.
- Poseer requerimientos de crecimiento y una tasa de crecimiento equivalentes o mayores a la del organismo patógeno.

Estos criterios aplican a la mayoría, de los alimentos que puedan ser vehículos de patógenos alimentarios(31).

4.3.1.1. Coliformes Totales:

El grupo coliforme es definido como todas las bacterias Gram negativas en forma bacilar que fermentan la lactosa a temperatura de 35 a 37°C, produciendo ácido y gas (CO₂) en 24 o 48 horas de incubación, pueden ser aerobias o anaerobias facultativas, son oxidasa negativa, no forman esporas y presentan actividad enzimático de la B-galactosidasa, Constituyen el 10% de los microorganismos intestinales de los seres humanos y otros animales. Además tiene una gran distribución en el ambiente como lo es en fuentes de agua, vegetación y suelos)

Entre ellos se encuentran los diferentes *Escherichia coli*, *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Klebsiella*.(25, 32-34)

La prueba mas relevante utilizada para la identificación del grupo de coliformes,es la hidrólisis de la lactosa. El rompimiento de este disacárido es catalizado por la enzima B-D- Galactosidasa. Ambos monosacáridos (la galactosa después es transformada en glucosa por reacciones bioquímicas) posteriormente son metabolizados a través del ciclo glicolítico y ciclo del citrato. Los productos metabólicos de estos ciclos son ácidos y/o CO₂.(32)

4.3.1.2. Coliformes fecales:

El grupo de coliformes fecales comprenden un grupo muy reducido de microorganismos los cuales son indicadores de calidad, ya que son de origen fecal. Están representados en su mayoría por el microorganismo *E.coli* pero se pueden encontrar con menos frecuencia *Citrobacter freundii* y *Klebsiella pneumoniae* siendo estos dos últimos clasificados como termotolerantes dado a la característica de soportar temperaturas hasta de 45°C(32, 33)

Las coliformes fecales hacen parte del grupo de coliformes totales, pero su diferencia de los demás microorganismo de este grupo radica en la característica de ser indol positivo, su rango de temperatura óptimo de crecimiento es bastante extenso y puede ir hasta los 45°C y son mejores indicadores de higiene de alimentos y en aguas, la presencia de estos esta directamente relacionada con la contaminación fecal de origen humano o animal, ya que las heces contienen dichos microorganismos, presentes en la flora intestinal y de ellos entre un 90% y un 100% son *E.coli* mientras que en aguas residuales y muestras de aguas contaminadas este porcentaje es de hasta un 59%.(32, 35)

4.3.1.3. Staphylococcus aureus.

El *Staphylococcus aureus* es un coco Gram positivo, inmóvil que forma agrupaciones irregulares de células usualmente parecidas a los racimos de uvas.

La intoxicación alimentaria estafilocócica es un síndrome caracterizado por náuseas, vómitos, diarrea, malestar y debilidad general. Los síntomas comienzan a manifestarse de 1 a 6 horas después de consumido el alimento. *Staphylococcus aureus* ha sido ampliamente caracterizado, ya que se sabe que este microorganismo produce una gran variedad de productos extracelulares. Muchos de ellos, como las enterotoxinas estafilocólicas, son factores virulentos que han estado implicados en enfermedades de humanos y animales. Estas enterotoxinas causan al menos dos enfermedades humanas comunes, síndrome de shock tóxico e intoxicaciones debidas a *Staphylococcus* en alimentos.(36)

Las intoxicaciones debidas a *Staphylococcus* en alimentos están clasificadas como unas de las causas más prevalentes de gastroenteritis en el mundo. Esto se debe a la ingestión de una o más enterotoxinas estafilocócicas preformadas en alimentos contaminados por miembros del género *Staphylococcus*, en donde predomina *Staphylococcus aureus*.

La principal fuente de contaminación de los alimentos por *Staphylococcus* se debe a la manipulación de estos por parte de personas contaminadas, ya que los humanos son el principal reservorio de este microorganismo. Si bien muchas especies del género *Staphylococcus* se consideran habitantes normales del cuerpo humano, *Staphylococcus aureus* es el patógeno más destacado. La diseminación de *Staphylococcus aureus* entre humanos y de los humanos a los alimentos puede ocurrir por contacto directo o indirectamente con la piel.

Algunas propiedades únicas de resistencia de *Staphylococcus aureus* facilitan la contaminación y crecimiento en alimentos. Fuera del cuerpo humano, *Staphylococcus aureus* es uno de los patógenos humanos no esporoformador más resistente, pues puede sobrevivir por extensos periodos de tiempo. Es por esto que para algunos alimentos procesados o tratados, *Staphylococcus aureus* es un buen indicador del grado de contacto con alimentos naturales no tratados de origen animal dentro del proceso de producción de alimentos(37).

4.3.1.4. Salmonella spp.

El género *salmonella* spp., pertenece a la Familia *Enterobacteriaceae*, son bacilos Gram-negativos de 0.7-1.5 x 2-0-5µm, generalmente móviles por flagelos peritricos a excepción de *S. gallinarum*, se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza y se encuentra como comensal y patógeno en el tracto gastrointestinal de humanos, mamíferos domésticos y salvajes, reptiles, aves, insectos y roedores, causando un amplio espectro de enfermedades en el hombre y los animales.(38, 39)

Salmonella spp se caracteriza bioquímicamente por su capacidad de fermentar la glucosa con producción de ácido y gas y por su capacidad de hidrolizar la lactosa y la sacarosa. Su rango óptima de temperatura para el crecimiento es de 37°C.(32, 40)

5. Técnica por diluciones en tubo Múltiple (Número más Probable o NMP)

El método ampliamente empleado para la identificación de Coliformes Totales y fecales es la Técnica por diluciones en tubo Múltiple (Número más Probable o NMP), su fundamento es la fermentación de la lactosa por parte de las bacterias coliformes incubadas a 35°C durante 24 a 48 horas, obteniendo como resultado una producción de ácido y gas el cual se manifiesta en campanas de fermentación cuando se tiene la presencia de estos microorganismos, se utiliza un medio de cultivo que contenga sales biliares. Esta determinación consta de 2 fases, la fase presuntiva y la fase confirmativa.

En la fase presuntiva el medio de cultivo que se utiliza es el caldo lauril sulfato de sodio que permite la recuperación de los microorganismos dañados que se encuentren presentes en la muestra y tengan la capacidad de utilizar a la lactosa como fuente de carbono. Durante la fase confirmativa se emplea como medio de cultivo el caldo lactosado bilis verde brillante el cual es selectivo y solo permite el desarrollo de aquellos microorganismos capaces de tolerar tanto las sales biliares como el verde brillante(41).

La determinación del número más probable de microorganismos coliformes fecales se realiza a partir de tubos positivos de la prueba presuntiva y se fundamenta en la capacidad de las bacterias para fermentar la lactosa y producir gas cuando son incubados a una temperatura de $44.5 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ por un periodo de 24 a 48 horas(41).

6. Métodos Microbiológicos

La importancia de la microbiología alimentos, de productos medicinales, de la calidad del agua, entre otros, tiene su fundamento en que los microorganismos y sus productos, especialmente los componentes celulares de la pared celular, las enzimas y las toxinas, pueden causar infecciones en humanos y animales.

Los métodos microbiológicos convencionales están basados en el cultivo y crecimiento sobre un agar, pudiéndose caracterizar la colonia después de 24 horas de incubación. Los ensayos de Gram y los ensayos clásicos de identificación han sido exitosos en los últimos 150 años(42).

La guía para la acreditación de laboratorios que realizan análisis microbiológicos, G-ENAC-04 de 2002, señala que la validación de los métodos de ensayo debe reflejar las condiciones reales de ensayo. Esto puede conseguirse utilizando productos contaminados naturalmente o productos inoculados con un nivel conocido de microorganismos contaminantes. El analista debe estar consciente de que la inoculación de una matriz con microorganismos contaminantes imita tan sólo de una manera parcial la presencia de contaminantes naturales. No obstante, a menudo es la mejor y la única solución disponible. La extensión de la validación necesaria dependerá del método y su aplicación(43).

6.1. Incertidumbre de Medición.

Los análisis microbiológicos se encuadran en la categoría de los ensayos que no permiten realizar un cálculo riguroso, metrológica y estadísticamente válido de la incertidumbre de medida. Los distintos componentes individuales de la incertidumbre deben identificarse y demostrar que están bajo control y evaluar su contribución a la variabilidad de los resultados. Algunos componentes como los efectos del pipeteado, el pesado y las diluciones, pueden medirse directamente y evaluarse fácilmente para demostrar que realizan una contribución insignificante a la incertidumbre global. Otros componentes, como la estabilidad y preparación de las muestras, no pueden medirse directamente y su contribución tampoco puede evaluarse por métodos estadísticos, pero debe considerarse también su importancia en la variabilidad de los resultados(42, 44)

7. Validación

Los estudios de Validación demuestran que un método es utilizable para un analito en una matriz determinada, usando la instrumentación especificada, la muestra a analizar, el tratamiento de datos especificado y que el método puede ser transferido de uno a otro laboratorio adecuadamente equipado en instrumentación y personal.

La validación de las metodologías, junto a otras actividades englobadas en el control del aseguramiento de la calidad, permite demostrar a los laboratorios que sus métodos analíticos proporcionan resultados confiables; razón por la cual la validación de las metodologías debe estar bien documentada y cumplir con los requisitos establecidos por la Norma ISO / IEC 17025.

Además, se debe tener en cuenta que el laboratorio debe validar sus metodologías en los siguientes casos: Métodos no estandarizados y métodos estandarizados usados fuera del alcance propuesto.

Los objetivos principales de la validación de los métodos analíticos son:

- Evaluar las características de desempeño del método.
- Demostrar que el método desarrollado por un laboratorio es útil para la aplicación propuesta.
- Demostrar que las modificaciones realizadas a un método no afectan su desempeño, obteniendo resultados confiables.
- Demostrar que un método es equivalente a otro.

7.1. Ensayos Microbiológicos Cualitativos.

Los métodos de ensayo microbiológicos cualitativos, tales como aquellos en los que el resultado se expresa en términos de detectado/no detectado (Salmonella spp; Listeria spp; Vibrio spp, entre otros), y los procedimientos de confirmación e identificación, deben ser validados estimando, cuando sea apropiado, su

especificidad, exactitud relativa, desviación positiva, desviación negativa, límite de detección, efecto matricial, repetibilidad y reproducibilidad(42)

7.1.1.1. Parámetros de desempeño de la validación

7.1.1.2. Exactitud

Se define como muestras conocidas que contienen un analito microbiano que es correctamente identificado por el método ensayado. Pueden utilizarse muestras de referencia inoculadas si están disponibles y son aplicables.

7.1.1.3. Recuperación

No puede ser estimada para métodos microbiológicos cualitativos a muy bajos niveles, porque la cuantificación a estos niveles no es precisa. Por esto se estima comparando la proporción de recuperación positiva con las obtenidas en paralelo con un método convencional reconocido. La homogeneidad de la muestra es crucial para una adecuada estimación de la recuperación.

7.1.1.4. Precisión

Es definido en términos de repetibilidad, reproducibilidad, y las consideraciones asociadas a positivo o negativo. Las diferentes matrices y los diferentes análisis son considerados como fuentes primordiales de variación.(32, 45)

7.1.1.5. Comparación con Métodos de Referencia Existentes.

Opcionalmente, los resultados del método de estudio pueden compararse con los resultados obtenidos por un método de cultivo convencional usando muestras analíticas de la misma porción. Alternativamente, es preferible incrementar el alcance de las matrices y/o lotes de cada tipo de matriz que va a ser examinado por el método de ensayo. Cuando se tiene una matriz particularmente difícil, vale la pena utilizar el método de comparación.

7.1.2. Ensayos Microbiológicos Cuantitativos.

En el caso de ensayos microbiológicos cuantitativos (recuento de aerobios mesófilos, recuento de mohos y levaduras, y recuento de bacterias ácido lácticas), debe considerarse la especificidad, sensibilidad, exactitud relativa, desviación positiva, desviación negativa, repetibilidad, reproducibilidad y el límite de cuantificación dentro de una variabilidad establecida y, en caso necesario, determinar cuantitativamente estos parámetros. Los resultados deben evaluarse utilizando métodos estadísticos apropiados (42)

7.1.2.1. Parámetros de desempeño de la validación

4.7.2.1.2. Exactitud

Usualmente se determina comparando el resultado del método del ensayo del conteo con los de un Método Oficial o un método convencional si no existe método oficial, en el rango de conteo aplicable (32)

4.7.2.1.3. Recuperación

Esta es la fracción del analito microbiano añadido a una muestra de ensayo (fortificado o muestra sembrada) antes del análisis, que es medido (recuperado) por el método ensayado. Este puede, en teoría ser corregido por cualquier contaminante natural, presente en el analito en la muestra sin fortificar. Con el microorganismo incurrido, la recuperación es la fracción del analito microbiano contado por un método estándar.

4.7.2.1.4. Linealidad

En general, los métodos de conteo microbianos conducen a resultados proporcionales a la concentración del analito, si las muestras son cuantitativamente diluidas a una concentración en el rango apropiado. Este rango es para dar 20 - 30 a 200 - 300 UFC por placa cultivada en un medio de cultivo sólido.

4.7.2.1.5. Limite de detección.

El contenido más bajo que puede ser medido es 10 - 100 UFC/g en métodos de placa para matrices de alimentos. Algunas veces el tamaño de las partículas de alimentos puede interferir con la visibilidad de las colonias. En el método de NMP, es de 0.03 UFC/g o menor, dependiendo del número de tubos y el tamaño mayor de la muestra cultivada pero los límites de confianza son amplios en el método de 3 a 5 tubos.

4.7.2.1.6. Limites de cuantificación y determinación.

Es la menor cantidad de analito en la muestra que puede ser determinada con adecuada precisión y exactitud. En el método de plaqueo convencional es de 2000 a 3000 UFC/g de alimento porque cerca de 0.01 g de alimento puede ser plaqueado sin dificultad de detección de colonias.

El límite de determinación, que se define como el más bajo contenido de analito que estando presente, debería ser detectado y a la vez identificado, es cercano a 100 UFC/g en la metodología del plaqueo y tan bajo como 0.01 UFC/g en la metodología de NMP.

4.7.2.1.7. Precisión

Repetibilidad Intralaboratorio: Los ensayos deben ser realizados al menos por lotes duplicados de tipos de productos específicos, con un mínimo de 5 replicas por lote por nivel microbiano. Para estudios precolaborativos de Métodos Oficiales, se requieren 4 niveles, control, bajo, medio y alto(42).

7.1.3. Parámetros adicionales para métodos cualitativos microbiológicos.

7.1.3.1. Matrices de muestra.

Se refiere a los métodos microbiológicos recomendados para alimentos y grupos de alimentos. Debe escogerse matrices donde el microorganismo crezca. Se requieren una o más matrices diferentes por categoría de alimentos. Se requiere un número intermedio de matrices si la aplicabilidad es menor a todos los alimentos pero mayor a una categoría de alimentos.

7.1.3.2. Microorganismos analitos.

Se utilizaran diferentes cepas para diferentes matrices. Idealmente deberían ensayarse una variedad de cepas o serotipos de los microorganismos analitos. Cada matriz debería ser ensayada con al menos una cepa aislada de la matriz, esto es uno de sus contaminantes naturales. Se ha sugerido que una amplia selección de serotipos sea estudiada.

7.1.3.3. Niveles de agregado de microorganismos.

Cada cepa es usada a un mínimo de 3 niveles por muestra analítica, la cepa debería cuantificarse al momento de la inoculación por el número más probable, NMP, o por el recuento de colonias en placa por profundidad.

7.1.3.4. Microbiota Interferente.

La mayor variable lote a lote de la matriz alimenticia, puede ser ensayada con un competidor a un nivel que de justo un efecto adverso medible con el medio de cultivo selectivo convencional. Se deberá pre-ensayar candidatos competitivos adecuados para escoger un solo competidor. No se recomienda el uso de una mezcla de cepas, típicamente con habilidades competitivas no caracterizadas.

Para distinguir los efectos de los competidores a partir de los efectos de la microbiota de la matriz analizada, el ensayo de competición debe ser corrido en ausencia de una matriz alimenticia o con una matriz esterilizada. La matriz de la microbiota natural puede ser de valor en la evaluación competitiva si se estima por recuento en placa el número de células iniciales.

8. Metodología para la búsqueda de literatura:

8.1. Búsqueda en bases de datos:

Redalyc

Se procedió a ingresar a la base de datos Redalyc con link de acceso <http://www.redalyc.org/> donde se introdujeron las palabras Validación AND microbiología AND queso y se obtuvieron 16 documentos de los cuales fueron tomados 3, En la misma base de datos con las palabras Validación AND microbiología AND alimentos de las cuales se obtuvieron 48 resultados de los cuales se tomaron 5 documentos. Posteriormente se introdujeron las palabras leche AND inocuidad y se obtuvieron 805 documentos de los cuales se tomaron 4 artículos.

Icontec

Se procedió a ingresar a la base de datos Icontec a través de la página de la Universidad Libre Seccional Pereira con link de acceso www.unilibrepereira.edu.co y allí se busco biblioteca donde se accedió a bases de datos remotas previamente accediendo a estas con el usuario y contraseña proporcionados por la Universidad y posteriormente se ingreso a Icontec donde se buscaron las referencias normativas, para leches el decreto 616 de 2006, la norma técnica Colombiana NTC 5894 para lo referente a quesos y la norma técnica Colombiana NTC 4516 del 2009 para el método horizontal para la detección y enumeración de coliformes, técnica del número más probable.

Scielo

Se procedió a ingresar a la base de datos scielo con link de acceso <http://www.scielo.org/php/index.php> donde se introdujeron las palabras Microorganismos indicadores de la contaminación de alimentos y se obtuvieron 7 documentos de las cuales se tomaron 6 de referencia. Posteriormente se agregaron las palabras Calidad del queso fresco al buscador donde se obtuvieron 5 documentos de los cuales se tomaron como referencia 5 documentos.

DialNet

Se ingreso a la base de datos dialNet a través de la página de la Universidad libre seccional Pereira, dependencias biblioteca y bases de datos remotas, donde se accedió con el usuario y contraseña proporcionados por la Universidad y estando en la base de datos se introdujeron las palabras Detección de microorganismos patógenos e indicadores donde se encontraron 8 documentos de los cuales 2 de estos fueron incluidos en la revisión bibliográfica, después se pusieron las palabras Leche cruda donde se encontraron 5 documentos y 2 fueron tomados como base para la revisión de literatura.

Google académico

En el buscador se procedió a introducir las palabras Validación coliformes totales y fecales donde se obtuvo mediante esta búsqueda 1230 resultados entre los cuales se tomaron 5 como soporte bibliográfico.

En el buscador se dieron las palabras Microorganismos indicadores de la contaminación de alimentos donde se obtuvieron 21.600 resultados donde se utilizaron 8 artículos

9. Productos, Resultados e Impactos esperados:

Metodología propuesta

La metodología propuesta para la realización del proyecto se basa en los procedimientos descritos en la norma técnica Colombiana Microbiología de alimentos y productos de alimentación animal. Método horizontal para la detección y enumeración de coliformes técnica del número más probable, dispuestos por la NTC 4516 del 2009.

Fase0: Preparación de la muestra

1. Pesar 10 gr de la muestra de queso x 9ml de agua peptona y se lleva al Stomacher (Primera dilución)
2. Realizar diluciones hasta 10^{-3} g/mL con agua peptonada al 0.1 %. En caso de trabajar con muestras congeladas, descongelarlas previamente entre 2° y 5 ° C.

Fase I: Prueba presuntiva

1. Un tubo con caldo lauril sulfato triptosa se inocula 1 ml de la primera dilución en 9 ml del caldo lauril sulfato triptosa y se incuba a 34°C durante 24 h o 48 h. (Realizar por triplicado)
 - 1.1. Un tubo con caldo bilis verde brillante se inocula con el contenido del tubo obtenido del paso 1 Cuando se ha observado la formación de turbidez o gas o ambos, y se incuba a 34°C durante 24 h o 48 h.
 - 1.2. La presencia de coliformes se confirma en el caso en que se haya observado la formación de turbidez y gas después del examen del tubo obtenido del numeral 1.1.

Fase II: Prueba confirmativa de microorganismos coliformes totales

2. Veinte tubos con medio Caldo lauril sulfato triptosa con doble concentración se inoculan con un 1ml de la muestra de la suspensión inicial.
 - 2.1. Veinte tubos con caldo lauril sulfato triptosa con una concentración sencilla se inoculan con 1 ml de la muestra, Después, bajo las mismas condiciones,

se inoculan con diluciones decimales de la suspensión inicial tubos adicionales que contengan medio con una concentración sencilla.

- 2.2. Los tubos que contienen el medio de enriquecimiento selectivo con doble concentración se incuban a 35°C durante 24 h, y los tubos que contienen el medio con concentración sencilla se incuban durante 24h o 48h, después de este periodo estos tubos se examinan para determinar la formación de gas o la turbidez que presume la detección de la formación de gas.
- 2.3. Una serie de tubos con el caldo lactosa bilis verde brillante se inoculan con los cultivos provenientes de los tubos del medio de enriquecimiento selectivo con doble concentración (caldo lauril sulfato triptosa) y con los cultivos de los tubos con medio de enriquecimiento selectivo de concentración sencilla (caldo lauril sulfato triptosa), en los cuales se ha observado la formación de gas o la turbidez que presume la detección de la formación de gas.
- 2.4. Los tubos que se obtienen en el numeral 2.3 se incuban a 30°C ± 1°C o 36°C ± 1°C (según acuerdo) durante 24 h o 48 h y se examinan para determinar la formación de gas.
- 2.5. Se calcula el número más probable de coliformes por mililitro o por gramo de muestra (es decir, el NMP) a partir de la cantidad de tubos en la serie nueva (2.4) que muestran formación de gas. Se utiliza una tabla para determinar el número más probable.

3. Fase III: Medio de enriquecimiento selectivo: caldo lauril sulfato triptosa.

Disuelva el medio en agua mediante calentamiento, si es necesario.

Ajuste el pH según la NTC 4092, si es necesario, de manera que después de la esterilización esté en 6.8 ± 0.2 a 20°C – 25°C.

Dispense el medio en cantidades de 10 ml en tubos con dimensiones aproximadamente de 16 mm x 160 mm que contengan tubos *Durham* en el caso del medio concentración sencilla, y en tubos con dimensiones aproximadamente de 20 mm x 200 mm que no contengan tubos *Durham* en el caso del medio con doble concentración.

Esterilice en autoclave ajustado a 121 °C durante 15 min. Los tubos *Durham* no deben contener burbujas de aire después de la esterilización.

4. Fase IV: Medio de confirmación: caldo lactosa bilis verde brillante

Disuelva el medio en agua mediante calentamiento, si es necesario.

Ajuste el pH, según la NTC 4092, si es necesario, de manera que después de la esterilización esté en 7.2 ± 0.2 a 20 -25 °C.

Dispense el medio en cantidades de 10 ml en los tubos de ensayo aproximadamente 16 mm x 160 mm que contienen los tubos Durham.

Esterilice en autoclave ajustado a 121 °C durante 15 min. Los tubos Durham no deben contener burbujas de aire después de la esterilización.

5. CÁLCULO Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

De acuerdo a los resultados de la interpretación, indique la presencia o ausencia de coliformes en la porción de ensayo de x g o x ml de producto.

Calcule el número más probable a partir del número de tubos positivos en cada dilución.

6. PRECISIÓN

Se reconoce que se pueden presentar amplias variaciones en los resultados con la técnica del NMP. Por lo tanto, los resultados obtenidos utilizando este método se deberían utilizar con precaución.

Los límites de confianza se suministran en la NTC 4092.

7. INFORME DE ENSAYO

El informe de ensayo deberá especificar:

- Toda la información necesaria para la identificación completa de la muestra
- El método de muestreo utilizado, si se conoce;
- El método de ensayo utilizado, con referencia a esta norma nacional;
- El objeto del ensayo y la temperatura de incubación utilizada;
- Todos los detalles operativos que no se especifican en esta norma o se consideran opcionales, junto con los detalles de todo incidente que haya podido tener influencia en los resultados;
- Los resultados obtenidos.

VALIDACIÓN

Para realizar la verificación de los métodos y dar cumplimiento a los requerimientos de la Norma NTC IEC/ISO 17025, se hará una validación de la técnica de diluciones en tubo NMP para coliformes totales, *E. coli*.

El estudio se desarrollara en las siguientes etapas:

Fase I: Pruebas Preliminares:

Implementación del control de calidad en los procedimientos internos del laboratorio, incluye: Control de calidad de los medios de cultivo, pruebas de esterilidad, productividad y selectividad, por el método ecométrico, control de calidad y metrológico de equipos.

Control de calidad de medios de cultivo:

Los medios de cultivo utilizados en los ensayos de laboratorio se someterán a diferentes controles, como el control macroscópico, un control de pH a 25°C, un control de esterilidad y un control de eficacia, en las que se medirán la productividad y selectividad del medio de cultivo, mediante la evaluación por el método ecométrico.

Control macroscópico:

Se realizará un examen visual para verificar la consistencia del medio, su color y aspecto (transparente, turbio, con o sin precipitado) y si estas descripciones corresponden a las especificaciones del medio.

Control de esterilidad:

Se servirán tubos de ensayo con caldo bilis verde brillante y caldo lauril sulfato triptosa. Del total de tubos se retiraran un número de este equivalente al 10% de la totalidad de cajas y tubos servidos.

-Se llevaran los tubos elegidos al azar a incubación a 35°C durante 48 horas.

-Se realizara verificación de ausencia de algún tipo de turbidez o gas en el tubo Durham en los tubos de ensayo.

-Se realizara prueba de verificación de crecimiento óptimo del medio con la cepa estándar ATCC 8739 correspondiente a *Escherichia Coli*.

Control de pH

Se tomara una muestra del medio preparado a una temperatura de 25°C y se toma su pH con el pHmetro. El valor obtenido debe corresponder al indicado en la dicha técnica del medio.

Prueba de selectividad y productividad (método ecométrico):

Caldo bilis verde brillante

Se toma una muestra de microorganismo blanco (*E.coli*) se realizara una suspensión en solución salina correspondiente a la dilución 10^0 , a partir de esta suspensión se toma 1ml y se lleva a 9ml de agua peptonada para obtener las diluciones correspondientes.

Se lleva a cabo 2NMP, uno en caldo tripticasa de soya y otro en caldo verde bilis brillante

Posterior se realiza mismo procedimiento para el microorganismo interferente. (s. aureus)

Los 4 NMP se llevan a incubar a 35°C durante 48 horas

Medio TSA y Sabouraud

Se toma una muestra de microorganismo blanco (*E.coli*) y se procederá a realizar una siembra masiva en las cajas que contengan los medios correspondientes.

Las cajas con medio TSA se llevan a incubar a 35°C durante 48 horas.

Las cajas que contengan el medio Sabouraud se dejaran a temperatura ambiente envueltas en papel kraft por 3 días.

Control de ambientes:

Cabina de flujo laminar:

Se colocan cajas con medio de cultivo para mesófilos PCA o TSA y para hongos Sabouraud en diferentes puntos del cuarto de siembre durante 15 minutos.

Se llevan las cajas a incubar a 35°C y temperatura ambiente, para mesófilos y hongos respectivamente. (Este control será llevado a cabo durante todas las pruebas a realizar)

Prueba de residuos de detergentes:

Se procederá a adicionar unas gotas del reactivo azul de lactofenol en una muestra de lote representativo de el material de vidrio a emplear, después de autoclavar y diligenciar su debido registro para cada lote.

Fase II: Validación, verificación de los procedimientos de ensayo para el análisis microbiológico de las matrices alimentarias
A la matriz de queso se le analizara:

- Técnica de diluciones en tubo múltiple, NMP

Estandarización, enriquecimiento y preparación del cultivo de trabajo a partir de las cepas de referencia ATCC 25922

Fase III: Determinación del desempeño de cada método de análisis

La verificación del método de ensayo para la determinación de Coliformes fecales y totales, se realizará mediante la estimación de los parámetros de especificidad, sensibilidad, repetibilidad y reproducibilidad. Se realizarán 5 replicas en cada método.

La cepa de referencia seleccionada para el estudio es la siguiente:

- Técnica de diluciones en tubo múltiple NMP: *Escherichia coli* ATCC 25922 como microorganismo de estudio.

Sensibilidad del Método

Se inoculara cada una de las muestras del estudio con un estándar de la cepa ATCC 25922 que corresponde a la técnica de diluciones en tubo múltiple NMP, con el fin de comprobar si el método de análisis detecta el inóculo agregado.

La cepa estándar ATCC utiliza para determinar esta variable es::

- Técnica de diluciones en tubo múltiple NMP: *E. coli* ATCC 8739

Repetibilidad

Para determinar la concordancia entre resultados de sucesivas mediciones se realizan 20 siembras de la misma muestra en el mismo tiempo, las mismas condiciones e igual analista.

Reproducibilidad:

Se realiza el recuento del método o el desarrollo de la técnica de detección en diferentes condiciones durante el proceso: diferentes analistas y en diferentes horas (mañana y tarde).

Especificidad

Se realiza el recuento del método o el desarrollo de la técnica de detección en diferentes condiciones durante el proceso: diferentes analistas y en diferentes horas (mañana y tarde).

Población y muestra

La verificación de las técnicas objeto del estudio se llevará a cabo en muestras de queso fresco producido a pequeña escala; que se realizará por el método de número más probable.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos serán visualizados y graficados mediante el programa estadístico ANOVA

Impactos científico y tecnológico del proyecto

La actuación de los laboratorios de ensayo representa un punto de articulación entre el sector empresarial y socio productivo, como una asociación en continua interacción donde se incrementa la demanda de servicios tecnológicos que exigen cada día además de una respuesta oportuna, resultados válidos y confiables. Por tal motivo se hace necesario que una tercera parte, es decir, una entidad acreditadora reconozca que el laboratorio de microbiología cumple con los requisitos especificados y es competente para desarrollar sus análisis microbiológicos.

La acreditación del Laboratorio representa una mejora cualitativa para el sector agroalimentario que requieren servicios que aseguren la trazabilidad de los diferentes procesos productivos, los cuales incluyen servicios como análisis de materias primas, productos en proceso o productos terminados.

Impactos ciencia y tecnología

La Facultad de Ciencias de la Salud a través del laboratorio de Microbiología busca con este estudio fortalecer los procedimientos para la estandarización y validación de las técnicas que frecuentemente se aplican para la evaluación microbiológica de alimentos, principalmente porque los laboratorios demandan la aplicación de regulaciones que garanticen la calidad de los servicios ofrecidos.

El laboratorio documentará los métodos permitiendo presentar una información clara, lógica y fácil de usar para el sector agroalimentario, estos métodos harán parte importante del Sistema de Gestión de la Calidad del laboratorio, de manera, que asegure procedimientos confiables, rápidos y económicos para la emisión de los resultados; que permitirán ubicar el laboratorio como ente acreditado, competente y de referencia para el análisis microbiológico de alimentos.

La acreditación traerá beneficios al sector agroalimentario en la reducción de los riesgos de inocuidad en la cadena de producción, desarrollo de competencias del personal, reconocimiento nacional e internacional, acceso a redes y cadena productivas, desarrollar una estructura de laboratorio orientada a objetivos específicos de formación y servicios tecnológicos bajo las especificaciones de la Norma ISO/IEC 17025 que demuestre frente a organismos reguladores la competitividad del servicio

APROPIACION SOCIAL DEL CONOCIMIENTO

Un curso de capacitación en pruebas microbiológicas

Impactos sobre el medio ambiente

Los impactos negativos directos del desarrollo de este proyecto son la generación de residuos sólidos y líquidos de origen biológico y químico, cuyo manejo y tratamiento están contemplados de acuerdo los requisitos de la Resolución N° 1164 del Ministerio de Salud y Protección Social de 2002 y las Normas de Bioseguridad del Manual de técnicas de análisis para control de calidad

microbiológico de alimentos para consumo humano del Instituto de Medicamentos y Alimentos, INVIMA, no se generan impactos de contaminación ambiental y de riesgo para la salud pública.

Bibliografía

1. Instituto Nacional de Salud. (INS). Boletín epidemiológico semanal. 2015.
2. Comisión Europea. De la granja a la mesa: alimentos sanos y seguros para todos. 2014.
3. International commission on microbiological specifications for foods. The International Union of Microbiological Societies. .
4. Vásquez, J.F.; Loaiza, E.T.; Olivera, M. Calidad higiénica y sanitaria de leche cruda acopiada en diferentes regiones colombianas. *Orinoquia*. 2012;16(2):13-23.
5. Araya VG, L.; Quesada, C.; Chaves, C.; Lamara, M. Evaluación bacteriológica de la leche y queso de cabra distribuidos en el Área Metropolitana de San José, Costa Rica. *Archivos latinoamericanos de nutrición*. 2008;58(2):182-6.
6. Moreno FCr, G.; Méndez, V.M.; Osuna, L.E.; Vargas, M.R. Análisis microbiológico y su relación con la calidad higiénica y sanitaria de la leche producida en la región del Alto de Chicamocha(departamento de Boyacá). *Medicina veterinaria*. 2007;14:61-83.
7. Signorini MLS, G.J.; Bonazza, J.C.; Santina, R.D.; Marti, L.E.; Frizzo, L.S.; Rosmini, M.R. Variación estacional en los principales indicadores de higiene en leche cruda de un tambo de la cuenca central. *FAVE-Ciencias Veterinarias*. 2003;2(2).
8. Decreto Número 616 de 2006. Leche para el consumo humano que se obtenga, procese, envase, transporte, comercializa, expende, importe o exporte en el país.
9. Elizangela KA, M.V.; Kozusny, D.I.; Rodrigues, D.F. Calidad microbiológica natural de la leche durante el proceso de ordeño y después de refrigerarse. *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*. 2012;7(1):1-12.
10. Jiménez JC. Identificación de los factores de riesgo fundamentales que se asocian con la inocuidad en la producción primaria de leche en predios del municipio de Pereira, Colombia: Universidad para la cooperación internacional (UCI); 2009.
11. Olivero RA, Y.; Cury, K. Comercialización De Leche Cruda En Sincelejo, Sucre, Colombia. *Colombiana ciencia animal*. 2011;3(1).
12. Magariños H. Producción higiénica de la leche cruda. 2000.
13. Calderón AG, F.; Martínez, G. Indicadores de calidad de leche crudas en diferentes regiones de Colombia. *MVZ-Córdoba*. 2006;11(1):725-37.
14. Signorini MLS, G.J.; Bonazza, J.C.; Santina, R.D.; Marti, L.E.; Frizzo, L.S.; Rosmini, M.R. Utilización de microorganismos marcadores para la evaluación de las condiciones higiénico-sanitarias en la producción primaria de leche. *FCV-LUZ*. 2008;18(2):207-17.
15. Espinoza AT, M.; Salinas, M.; Sánchez, V. Determinación de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos de producción artesanal que se expenden en los mercados del distrito de Ica, enero marzo 2003. *Revista peruana de medicina experimental y salud pública*. 2004;21(2):71-5.
16. Villalobos LBM, R.E. Aislamiento e identificación por métodos convencionales y pcr de *listeria monocytogenes* en quesos blancos frescos comercializados en Cumana, Venezuela. *Revista Científica*. 2007;17(5):529-36.
17. Marzocca MAM, P.L.; Sica, M.G.; Alvarez, E.E. Detección de *Listeria monocytogenes* en distintos productos alimenticios y en muestras ambientales de una amplia cadena de supermercados de la ciudad de Bahía Blanca (Argentina). *Revista Argentina de Microbiología*. 2004;36:179-81.
18. Roldán MLC, I.; Otero, J.L.; Miliwebsky, E.S.; Alfaro, N.; Burns, P.; Rivas, M. Aislamiento, caracterización y subtipificación de cepas de *Escherichia coli* O157-H7 a partir de productos cárnicos y leche. *Revista Argentina de Microbiología*. 2007;39(2):113-9.

19. Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. Microbiología de alimentos y productos para alimentación animal. ICONTEC, 20011 (NTC 5894).
20. Cristóbal RLM, D.J. Evaluación bacteriológica de quesos frescos artesanales comercializados en Lima, Perú, y la supuesta acción bactericida de *Lactobacillus* spp. *Rev Panam Salud Publica*. 2003;14(3).
21. Albarracín FYS, P.; Carrascal, A.K.; Mercado, M. Estimación de la proporción de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp en quesos fresco (queso de hoja cuajada, cuajada) y queso doble Crema producidos y comercializados en el Municipio de Pamplona, Norte de Santander. *Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*. 2006;4(2):30-41.
22. Rodríguez CC, L.; Ogeerally, P. Calidad sanitaria en queso artesanal tipo "telita". *Update*, estado Bolívar, Venezuela. *Sociedad Venezolana de Microbiología* 2009;29(2):98-102.
23. Vásquez ND, L.; Sánchez, C.; Acevedo, I. Evaluación de las características fisicoquímicas y microbiológicas del queso blanco a nivel de distribuidores, estado Lara, Venezuela. *Zootecnia Trop*. 2012;30(3):217-23.
24. Gonzáles EP. Caracterización de la composición físico química del queso fresco elaborado artesanalmente en Sehuilaca, municipio de Minatitlán, Veracruz: Universidad Veracruzana; 2010.
25. Pullés MR. Microorganismos indicadores de la calidad del agua potable en Cuba. *CENIC Ciencias Biológicas*. 2014;45(1):25-36.
26. Sargeant D. Fecal Contamination Source Identification Methods in Surface Water. *Ecology Report* 1999:1-18.
27. Borbolla MEV, M.R.; Piña, O.E.; Ramírez, I.; Vidal, J.J. Contaminación de los alimentos por *Vibrio cholerae*, coliformes fecales, *Salmonella*, hongos, levaduras y *Staphylococcus aureus* en Tabasco durante 2003. *Salud en Tabasco*. 2003;10(2):221-32.
28. Vergaray GM, C.R.; Morante, H.Y.; Heredia, V.L.; Béjar, V.R. *Enterococcus* y *Escherichia coli* como indicadores de contaminación fecal en playas costeras de Lima. *Instituto de Investigaciones FIGMMG*. 2007;10(20):82-6.
29. Suárez M. Tendencia actual del estreptococo como indicador de contaminación fecal. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*. 2002;40(1):38-43.
30. Ramos LMV, L.A.; Vilardy, Q.S.; Saavedra, D.L. Análisis de la contaminación microbiológica (Coliformes Totales y fecales) en la Bahía de Santa Marta, Caribe Colombiano. *Acta biológica Colombiana*. 2008;13(3):87-98.
31. Jay, M.; Loessner, M. y Golden, D. (2005). *Modern Food Microbiology*. 7 edición. Springer. p. 474-476.
32. Carrillo EML, A.M. Validación del método de detección de coliformes totales y fecales en agua potable utilizando Agar Chromocult: Pontificia Universidad Javeriana; 2008.
33. Soler JP. Validación secundaria del método de número más probable y recuento en placa profunda para coliformes totales y fecales en muestras de alimentos basada en la Norma ISO NTC 17025: Pontificia Universidad Javeriana; 2006.
34. Gonzáles UDP, V.J.; Clemente, A.; Mazariegos, M.A.; Ruiz, M.J.; Rodríguez, M.A. Determinación de coliformes totales en los productos lácteos y su comparación entre dos queserías del municipio de Pijijiapan, Chiapas, México. *Bioquímica*. 2007;32:98.
35. Gonzáles MV, L.B.; Vásquez, A.; Grau, C.; Gil, H. . Enumeración de aeróbios mesófilos, coliformes fecales y *Clostridium perfringens* en la ostra *Crassostrea rhizophorae* procedente de Laguna Grande del Obispo, estado Sucre, Venezuela. *Revista Científica*. 2011;21(1):80-7.
36. Doyle, M. Beuchat, L. y Montville, T. (1997). *Food Microbiology: Fundamentals and frontiers*. American Society for Microbiology Press. Washington D.C.

37. Díaz CG, B. Staphylococcus aureus en queso blanco fresco y su relación con diferentes microorganismos indicadores de calidad sanitaria. RESPYN. 2001;2(3):1-9.
38. Cabrebra AG, E. Identificación de microorganismos indicadores y determinación de puntos de contaminación en aguas superficiales provenientes del cementerio jardines del recuerdo ubicado en el norte de Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana; 2006.
39. Quiñones EIV, C.; Pedroche, F.F.; Moreno, L.; Rodas, O.R. Presencia de los géneros Vibrio y Salmonella, y detección de coliformes fecales en almejas del Golfo de México. Hidrobiológica. 2000;10(2):131-8.
40. Hernández CH, A.N.; Cháidez, C.; Rendón, G.; Suslow, T. Detección de Salmonella y coliformes fecales en agua de uso agrícola para laproducción de melón "Cantaloupe". Agricultura Técnica en México. 2008;34(1):75-84.
41. Camacho AG, M.; Ortegón, A.; Palao, M.; Serrano, B.; Velázquez, O. Método para la determinación de bacterias coliformes, coliformes fecales y Escherichia Coli por la técnica de diluciones en tubo múltiple (Número más Probable o NMP). 2009. In: Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos [Internet].
42. Microbiology Guidelines for Methods Validation. Microbiology Guidelines: Journal of AOAC International. Vol. 82, Nº 2 (1999).
43. Ortega mR, C.; Zhurbenko, R. Validación de métodos alternativos para análisis microbiológicos de alimentos y aguas. Métodos cualitativos. Revista Cubana de Higiene y Epidemiología. 2010;48(2):162-76.
44. Pullés MRN, M.R.; Espinosa, M.;. Estimación de la incertidumbre en los ensayos microbiológicos de ColiformesTtotales y Fecales en aguas y aguas residuales mediante la tecnica de Tubos Múltiples de Fermentación. CENIC Ciencias Biológicas. 2005;36.
45. Sánchez JFT, M.E.; Koch, W.; Mora, J.L.; Marroquín, R.; Hernández, V.; Islas, V.; Sánchez, E.G.; León, A. Validación de métodos analíticos no cuantitativos. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. 2010;41(2):15-24.